
Verfahren und Vorrichtung zur Charakterisierung von Zellen, Zellverbänden
und/oder Geweben

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zur Charakterisierung von Zellen, Zellverbänden und/oder Geweben.

Zelltherapeutische Verfahren besitzen als zentrales Werkzeug der regenerativen Medizin einen hohen Stellenwert für zukünftige innovative Behandlungsmethoden. Dabei werden Zellen in vitro in industriellem Maßstab standardisiert gezüchtet und ggf. manipuliert. Des Weiteren ist es bekannt, Zellkulturen als Versuchsobjekte in der Pharmaindustrie zur Austestung von Pharmaka einzusetzen.

Das Erscheinungsbild einer zwei- oder dreidimensionalen Zellkultur besitzt sowohl auf Einzelzellniveau als auch auf Niveau der Gesamtzellpopulation spezifische morphologische Merkmale, die jeweils von der Art der kultivierten Zellen abhängig sind. So unterscheiden sich die Zellen z. B. in ihrer Größe, Form, in der Größe des Zellkerns, in der Granularität, der migratorischen Aktivität, der räumlichen Beziehung der Zellen untereinander (dispers oder kohärent) oder bei dreidimensionalen Zellkulturen in ihrer räumlichen Ausrichtung.

Soll die Zellkultur beschrieben bzw. in ihrer Qualität beurteilt werden, werden derzeit vor allem mikroskopische Verfahren verwendet, um die Charakteristika der Zellkultur zu erfassen. Hierbei ist jedoch die morphologische Beurteilung der Zellpopulation, die weitgehend „per Hand“ (nicht automatisiert) durchgeführt wird, stark vom Wissen und der Erfahrung des Untersuchers abhängig und bleibt daher subjektiv. Gegenüber anderen Verfahren zur Charakterisierung der Zellpopulation (z. B. molekularbiologische Methoden, FACS-Analysen) hat die morphologische Beurteilung die Vorteile, dass sie online durchgeführt werden kann, ohne die zu analysierende Zellpopulation in ihrem Wachstum zu stören, dass einzelne Zellen einer Population analysiert werden können, dass sie schnell durchgeführt werden kann und schließlich dass sie preiswert ist.

Im folgenden wird exemplarisch ein heute übliches Verfahren zur Züchtung von adhärennten Zellen dargestellt. In mehreren Phasen des Verfahrensablaufes sind morphologische Beurteilungen der Zellkultur notwendig:

In einem ersten Schritt (Isolation der Zellen) werden die zu kultivierenden Zellen aus ihrem Ursprungsgewebe durch enzymatische und mechanische Verfahren herausgelöst und nach Aufreinigungen in entsprechenden Kulturgefäßen überführt. Abhängig von den Eigenschaften des Ursprungsgewebes (z. B. Knochen, Knorpel, Fettgewebe) kommen hierbei unterschiedliche Verfahren und Protokolle zum Einsatz.

Die Zellen werden nach der Isolation in einem weiteren Schritt (Kultivierung der Zellen in vitro) in einer Nährlösung („Medium“) aufgenommen, in ein Zellkulturgefäß überführt und in einem Inkubator bei 37°C und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Nährlösung besteht neben Wasser aus einem Gemisch an Salzen, Nährstoffen, Vitaminen sowie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, dessen Zusammensetzung für die Art der zu kultivierenden Zellen spezifisch ist. Die notwendigen Medien sind nur bis zu einem gewissen Grad erhältlich und werden in der Regel im Labor eigenhändig zusammengemischt. Das Medium wird in regelmäßigen Ab-

ständen gewechselt, indem das alte Medium abgesaugt und neues hinzugegeben wird. Bei einigen Zellkulturen ist es notwendig, im Laufe der Kultivierung nach einem definierten Protokoll verschiedene Medien mit unterschiedlichen Zusammensetzungen hinzuzugeben. Da adhärente Zellkulturen auf der Oberfläche des Zellkulturgefäßes wachsen, muss in regelmäßigen Abständen mikroskopisch kontrolliert werden, ob auf der Oberfläche noch genügend Platz zum Wachsen vorhanden ist („Grad der Konfluenz“). Wenn dieses nicht mehr der Fall ist, so müssen die Zellen auf mehrere neue Zellkulturgefäße aufgeteilt werden („Passagierung“).

Bei der Passagierung werden die adhärenenten Zellen durch enzymatische oder mechanische Verfahren von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst. Durch Zentrifugation werden die Zellen aufgereinigt, anschließend gezählt und in einer definierten Menge in neuen Kulturgefäßen ausgesät.

Neben der Bestimmung des Konfluenzgrades wird in regelmäßigen Abständen die Qualität der Zellpopulation beurteilt (Analysen während der Kultivierung). Besonderes Augenmerk wird dabei auf eine typische Morphologie der Zellen, auf das Wachstumsverhalten sowie eventuell vorhandener Kontaminationen durch Mikroorganismen oder nicht erwünschte Zellpopulationen gelegt. Die Analysen werden in Form einer mikroskopischen Beurteilung durchgeführt. Diese kann online angewendet werden, ist aber personalintensiv. Zudem erfordert die mikroskopische Beurteilung ein morphologisch geschultes Auge und bleibt in einigen Bereichen (insbesondere bei der Beurteilung der typischen Zellmorphologie) subjektiv.

Es ist die Aufgabe der Erfindung, eine Vorrichtung und ein Verfahren bereitzustellen, mittels dessen Zellen, Zellverbände und/oder Gewebe objektiv morphologisch charakterisierbar sind.

Diese Aufgabe wird durch eine Vorrichtung mit den Merkmalen des Anspruchs 1, durch eine Vorrichtung mit den Merkmalen des Anspruchs 7 sowie durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 10 gelöst.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung umfasst eine Analyseeinheit, die Mittel aufweist, mittels derer morphologische Parameter von Zellen, Zellverbänden oder Geweben erfasst werden. Ferner weist die Vorrichtung Mittel auf, mittels derer die erfassten Parameter zum Zwecke der objektiven morphologischen Charakterisierung der Zellen, der Zellverbände oder des Gewebes ausgewertet werden. Ein wesentlicher Gedanke der erfindungsgemäßen Vorrichtung bzw. des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, das morphologische Bild der Zellkultur bzw. einzelner Zellen vorzugsweise durch eine Vielzahl von morphometrischen Daten zu beschreiben. Es können auf diese Weise morphometrische Werte erhalten werden, die charakteristisch für die jeweilige Zellkultur bzw. die jeweiligen Einzelzellen sind („morphometrisches Finger-Printing“). Im Gegensatz zu einer bildlichen Erfassung der Morphologie ist der morphometrische Finger-Print objektiviert. Die erfindungsgemäße Analyseeinheit weist vorzugsweise eine z.B. Software-gestützte bildgebende Einheit, beispielsweise ein Mikroskop, und eine Software-gestützte bildanalytische Einheit auf, wobei in der bildanalytischen Einheit integriertes Expertenwissen vorliegt, um die Auswertung der erfassten Parameter bzw. eine zutreffende Charakterisierung vornehmen zu können.

Die Analyseeinheit ist vorzugsweise derart ausgeführt, dass der Grad der Konfluenz, die Zellmorphologie als Maß für die Qualität der Zellkultur, das Proliferationsverhalten, die Kontamination mit Mikroorganismen oder anderen Zellpopulationen und/oder die Zelldifferenzierung ermittelbar und auswertbar ist. Denkbar ist es beispielsweise, die Zellgröße, die Zellform, die Größe des Zellkerns, die Granularität, die migratorische Aktivität, das Wachstumsverhalten, die räumliche Beziehung der Zellen untereinander (dispers, kohärent) oder bei dreidimensionalen Zellkulturen auch die räumliche Ausrichtung der Zellen zu erfassen und sodann auszuwerten.

Grundsätzlich ist es möglich, eine Auswertung der erfassten Parameter durch die Bildung von Indizes vorzunehmen, die die erfassten Werte auf geeignete Weise miteinander in Beziehung setzen. Denkbar ist beispielsweise, als Objekt-Index einen Quotienten aus dem Umfang der Zellen sowie aus dem vierfachen Wert der

Quadratwurzel der Zellfläche zu bilden. Dieser Index kann beispielsweise dazu herangezogen werden, eine Fibroblastenkultur von einer Endothelzellkultur zu unterscheiden. Grundsätzlich können aus den erfassten Parametern beliebige Indizes gebildet werden, die hinsichtlich der Charakterisierung der Zellen, Zellverbände oder des Gewebes hinreichende Unterscheidungskraft aufweisen.

In weiterer Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass die Analyseeinheit Mittel zur statistischen Auswertung der erfassten Parameter aufweist. Bei einer derartigen Ausführung der Erfindung kann eine Statistik aus morphometrischen Werten, die charakteristisch für die jeweilige Zellkultur bzw. die jeweiligen Einzelzellen ist, erstellt werden. Die statistisch ermittelten Parameter können beispielsweise der Mittelwert, die Standardabweichung und der Median der morphologischen Werte sein. Dabei kann sich die statistische Auswertung auf die unmittelbar erfassten Parameter, wie beispielsweise die Größe der Zellen beziehen, oder auch auf die oben genannten Indizes, die in geeigneter Weise aus den erfassten Werten gebildet werden können, sofern dies für die Charakterisierung hilfreich ist.

In weiterer Ausgestaltung der Erfindung ist eine Datenbank mit Referenzparametern vorgesehen, die für die Zellen, Zellverbände bzw. das Gewebe typisch sind. Ferner ist vorgesehen, dass die Vorrichtung Vergleichsmittel aufweist, mittels derer die erfassten Parameter mit den Referenzparametern vergleichbar sind. Aufgrund dieses Vergleiches kann automatisiert bzw. objektiviert eine Aussage über die Zellpopulation bzw. die Art und Gestalt des Zellverbandes oder des Gewebes geliefert werden. Möglich ist es, durch Experten eine Datenbank aufzubauen, in der die morphometrischen Daten für Referenzkulturen bzw. Zellen vorliegen. Durch Vergleich der Werte einer zu untersuchenden Zellkultur mit denen aus der Datei kann somit indirekt Expertenwissen in die morphologische Untersuchung integriert und die morphologische Beschreibung der zu untersuchenden Zellkultur objektiviert werden. Durch Vergleich von statistisch erfassten morphometrischen Charakteristika der zu untersuchenden Zellkultur mit denen aus einer Datenbank kann ohne die Anwesenheit eines Experten die Qualität der Zellkultur beurteilt werden. In ähnlicher Weise kann die Datenbank auch zur Identifizierung einzelner, für den Untersu-

cher unbekannter Strukturen (z. B. Sedimentablagerungen, subzelluläre Strukturen) sowie zum Aufspüren von morphologisch fassbaren Phänomenen (Screening für mikrobielle Kontaminationen) verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren bzw. die erfindungsgemäße Vorrichtung kann eine Auswertung mittels unmittelbar erfaßter Größen, wie z.B. der Zellgröße, oder mittels der genannten Indizes vornehmen, die in geeigneter Weise gebildet werden können.

In weiterer Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass die Analyseeinheit Mittel aufweist, mittels derer benachbarte Pixel des erfassten Bildes mit ähnlichem Helligkeitswert zu einem Bildobjekt zusammengefasst werden. Da sich in den Phasenkontrastbildern die morphologischen Strukturen (z. B. Zellgrenzen) praktisch nur über die Helligkeitswerte und nicht über Farbunterschiede abzeichnen, spiegeln die entstandenen Bildobjekte die morphologischen Strukturen wieder. Dabei können die Bildobjekte durch Zusammenfassung benachbarter Pixel mit ähnlichem Helligkeitswert zusammengefasst werden.

Die Erfindung betrifft ferner eine Vorrichtung zur Kultivierung von Zellen, Zellverbänden und Geweben mit einem Inkubator. Die Vorrichtung ist dadurch gekennzeichnet, dass sie ferner eine Vorrichtung zur objektiven Charakterisierung der Zellen, der Zellverbände oder des Gewebes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 aufweist. Die Besonderheit der Erfindung besteht darin, dass die Vorrichtung zur objektiven Charakterisierung der Zellen, der Zellverbände oder des Gewebes integraler Bestandteil einer Apparatur zur Kultivierung von Zellen, Zellverbänden bzw. Gewebe ist. In bevorzugter Ausgestaltung der Erfindung handelt es sich um eine Apparatur zur automatischen Kultivierung von Zellen, Zellverbänden und Gewebe, d.h. einen Zellkulturautomaten mit integrierter Analyseeinheit zur objektiven Charakterisierung der Zellen, Zellverbände bzw. des Gewebes. Ferner ist bevorzugt, dass auch die Analyseeinheit automatisiert morphologische Parameter während der Kultivierung erfasst und auswertet.

Dabei besteht die Möglichkeit, das Ergebnis der Auswertung in die Entscheidungsprozesse der Automatisierung einfließen zu lassen, d.h. die Vorrichtung bzw. die Zellkultivierung in Abhängigkeit der Auswertung zu betreiben.

In bevorzugter Ausgestaltung der Erfindung weist die Vorrichtung ferner einen Manipulator, einen Transporter zum Transport der Kulturgefäße zwischen dem Inkubator, dem Manipulator und der Analyseeinheit sowie eine Steuereinheit auf, mittels derer die Vorrichtung vorzugsweise automatisch betreibbar ist. Die Erfindung gemäß dieser Ausgestaltung weist somit mehrere Funktionsgruppen auf, die im folgenden näher beschrieben werden:

Der Detektor stellt ein Kernelement der Erfindung dar. Er dient zur Überwachung der Zellpopulation während der Kultivierung. Der Detektor bzw. die oben genannte Analyseeinheit besteht aus einer bildgebenden Einheit sowie einer Softwaregestützten bildanalytischen Einheit mit integriertem Expertenwissen, mit der die morphologischen Parameter in ihrer Komplexität erfasst werden können.

Da für die Zellkultivierung von Zellen Körperbedingungen simuliert werden müssen, ist dem Zellkulturautomaten ein Inkubator (Brutschrank) integriert.

Der Manipulator bewerkstelligt all die Arbeitsschritte automatisch, die bislang rein per Hand oder mit teilweise maschineller Unterstützung durchgeführt werden. Hierzu gehören u.a. Absaugen und Pipettieren von Lösungen, Zentrifugieren, Öffnen der Kulturgefäße, mechanisches Ablösen der Zellen etc.

Mithilfe des Transporters, der aus einer Kombination aus Förderband und Roboter mit Greifarm besteht, werden die Zellkulturgefäße zwischen den automatischen Komponenten Detektor, Inkubator und Manipulator hin und her transportiert.

Des weiteren ist eine intelligente Steuereinheit vorgesehen, die die Einzelkomponenten der Vorrichtung ansteuert und deren Tätigkeit koordiniert. Die zur intelligen-

ten Bearbeitung notwendigen Informationen erhält die Steuereinheit durch den Detektor bzw. die Analyseeinheit.

In weiterer Ausgestaltung dieser Vorrichtung führt die Software-gestützte bildanalytische Einheit automatisch komplexe morphometrische Bildanalysen durch. Diese Einheit zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass das Expertenwissen sehr flexibel implementiert werden kann, das zur Erfassung und Bewertung der komplexen Morphologie erforderlich ist.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 10. Vorteilhafte Ausgestaltungen des Verfahrens sind Gegenstand der Unteransprüche.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung werden anhand eines in der Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispiels näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 bis 4: unterschiedliche exemplarische Abbildungen von zu charakterisierenden Zellpopulationen,

Fig. 5: Darstellungen einer konfluenten Fibroblastenstruktur (A) und einer Endothelzellkultur (B),

Fig. 6: Kontur der Bildobjekte (A: Fibroblasten-, B: Endothelzellen),

Fig. 7a: Häufigkeitsverteilung des Bildobjekt-Indexes (Umfang / (4 x Quadratwurzel der Fläche)) der Bildobjekte gemäß Fig. 5,

Fig. 7b: Häufigkeitsverteilung der Hauptachsenrichtung der Zellpopulationen gemäß Fig. 5.

Figur 1 zeigt exemplarisch eine zu charakterisierende Zellkultur. Denkbare Charakterisierungsmerkmale sind: Zellpopulation besteht aus x % rundlichen und y %

länglichen Zellen; die Zellen tragen am Rand kleine Bläschen; teilweise formieren sich die Zellen in Strängen.

Typische Charakteristika der Zellstruktur gemäß Figur 2 sind: Zellen bilden dreidimensionale Gebilde; die Zellen sind eher länglich, die Zellen sind wenig granuliert.

Charakteristika der Zellen gemäß Figur 3 sind: Die Zellen zeichnen sich durch extreme Streifung aus („Stress Fibers“), die Zellen haben einen prominenten Nucleolus, die Zellen sind flächig, die Zellen sind groß, die Zellen haben einen zackigen Rand.

Charakteristika der Zellen gemäß Figur 4 sind: Es liegen zwei Zellpopulationen vor, nämlich große flächige Zellen, in einem lockeren Verband liegend, teilweise gestreift, und kleinere rundliche Zellen, die einen pflastersteinartigen Verband bilden.

Wie dies nachfolgend noch näher beschrieben wird, können die oben genannten, mittels einer bildgebenden Einheit erfassbaren Parameter der Zellpopulationen zu deren Charakterisierung herangezogen werden.

Das Prinzip des erfindungsgemäßen Verfahrens bzw. die Arbeitsweise der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird anhand eines im folgenden dargestellten Beispiels näher erläutert. Ziel ist es, mithilfe eines morphologischen Indexes eine Fibroblastenkultur von einer Endothelzellkultur zu unterscheiden. Die Zellkulturen sind aus Figur 5 ersichtlich, wobei Figur 5 A die Fibroblastenkultur und Figur 5-B die Endothelzellkultur darstellt. Die Charakterisierung erfolgt mithilfe einer morphometrischen Analyse der Zellkulturbilder (Phasenkontrastbilder).

Es wurde ein Analyseregelerwerk gebildet, nach dem benachbarte Pixel mit ähnlichem Helligkeitswert zu Bildobjekten zusammengefasst werden. Da sich in den Phasenkontrastbildern die morphologischen Strukturen (z. B. Zellgrenzen) praktisch nur über die Helligkeitswerte und nicht über Farbunterschiede abzeichnen, spiegeln die entstandenen Bildobjekte die morphologischen Strukturen wieder. Wie man bei

der Betrachtung des Erscheinungsbilds der beiden Zellkulturen gemäß Figur 5 sieht, zeichnet sich die Fibroblastenkultur vor allem durch längliche morphologische Strukturen aus (spindelförmiger Aspekt von Fibroblasten), während die Endothelzellkultur einen pflastersteinartigen Aspekt hat (Figur 5). Die untenstehenden Abbildungen zeigen, dass sich dieses auch in Form der während der Computeranalyse entstandenen Bildobjekte widerspiegelt: Bei der Fibroblastenkultur sind vermehrt Objekte mit länglichem Charakter zu finden, die ein im Vergleich zu den Bildobjekten der Endothelzellkultur geringeres Maß an Fraktalität aufweisen, wie dies aus Figur 6 hervorgeht.

Von jedem Bildobjekt wurde nun Umfang und Fläche (jeweils in Pixel) in eine Excel-Tabelle ausgegeben. Anschließend wurde ein Objektindex wie folgt definiert: $\text{Index} = \text{Objektumfang} / (4 \times \text{Quadratwurzel}(\text{Objektfläche}))$.

Diese Formel beschreibt das Maß der Fraktalität. Der Faktor $1/4$ sowie die Quadratwurzel bewirken eine Normierung der Bildobjekte, so dass auch Objekte unterschiedlicher Größe miteinander verglichen werden können (der Quotient Objektumfang/Fläche ist stark von der Größe der Objekte abhängig).

Für jedes Bildobjekt wurde nun dieser Index berechnet. Stellt man nun sämtliche Objekt-Indexwerte der Bildobjekte in einem Histogramm dar, so erhält man eine Art Kennkurve für die jeweilige Zellkultur, wie dies aus Figur 7a hervorgeht. Kenngrößen zur Beschreibung des Histogrammverlaufs sind z. B. der Mittelwert, die Standardabweichung sowie der Median. Man erkennt, dass die beiden Kurven gemäß Figur 7a einen unterschiedlichen Verlauf zeigen. Die Kurve für die Endothelzellkultur ist bauchiger. Auch die Werte für den Mittelwert, die Standardabweichung sowie den Median sind für die Fibroblasten- und Endothelzellkultur unterschiedlich (Fibroblasten: Mittelwert 2,17; Standardabweichung: 0,91; Median: 1,96. Endothelzellen: Mittelwert: 2,36; Standardabweichung: 0,96; Median: 2,18).

Die genannten Werte können somit zur objektiven numerischen Charakterisierung der Zellkulturmorphologie herangezogen werden.

Ein weiteres Charakteristikum, das die Fibroblastenkultur von der Endothelzellkultur unterscheidet, ist die Ausrichtung der einzelnen Bildobjekte. Wie man in Figur 6 erkennt, liegen die Hauptachsen von benachbarten Bildobjekten in der Fibroblastenkultur größtenteils parallel, während dieses bei der Endothelzellkultur wesentlich weniger der Fall ist. Auch diese Objekteigenschaft ist durch entsprechende Programmierarbeit mathematisch erfassbar und kann zur Charakterisierung der morphologischen Erscheinung der Zellkulturen herangezogen werden (Figur 7b). Der Mittelwert der links dargestellten Verteilung beträgt 15,97 für die Fibroblastenzellkultur, der der rechts dargestellten Verteilung 36,04 für die Endothelzellkultur.

In entsprechender Weise können zahlreiche Indizes definiert und zur Charakterisierung herangezogen werden. Hierzu können die Indizes z. B. in einem zweidimensionalen Array angeordnet und die Indexwerte farbkodiert werden. So entsteht ein für die Zellkultur charakteristisches farbiges Muster.

Zum anderen können aber die einzelnen Indexwerte durch arithmetische Operationen zu einem neuen Index zusammengefasst werden. So gäbe es z. B. Sinn, den oben definierten Index aus Umfang und Fläche (Fraktalität) mit dem Index zu kombinieren, der die Parallelität beschreibt, da für die Bildobjekte der Fibroblastenkultur charakteristisch ist, da sie sowohl eine relativ geringe Fraktalität besitzen als auch parallel angeordnet sind. Der so definierte neue Index hat durch die Kombination bessere Unterscheidungskraft.

Aufgrund des wachsenden Wirtschaftssektors in dem Bereich der zelltherapeutischen Verfahren wird es mehr und mehr nötig sein, Zellen unter zertifizierbaren Bedingungen zu züchten. Dies gilt auch für den Bereich der pharmazeutischen Industrie, in der Medikamente anhand von Zellkulturen getestet werden. Durch Vergleich des statistisch erfassten morphometrischen Finger-Prints einer Zellkultur mit dem, der in der Datei für diesen Zelltyp als Referenz abgelegt ist, ist es möglich, auch die morphologische Beurteilung zu zertifizieren.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Charakterisierung von Zellen, Zellverbänden und/oder Gewebe mit einer Analyseeinheit, die Mittel aufweist, mittels derer morphologische Parameter von Zellen, Zellverbänden und/oder von Gewebe erfasst werden, und die Mittel aufweist, mittels derer die erfassten morphologischen Parameter zum Zwecke der objektiven morphologischen Charakterisierung der Zellen, Zellverbände und/oder des Gewebes ausgewertet werden.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyseeinheit eine bildgebende Einheit und eine bildanalytische Einheit umfasst.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyseeinheit derart ausgeführt ist, dass der Grad der Konfluenz, die Zellmorphologie als Maß für die Qualität der Zellkultur, das Proliferationsverhalten,

die Anwesenheit von Mikroorganismen und/oder die Zelldifferenzierung ermittelbar und auswertbar ist.

4. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyseeinheit Mittel zur statistischen Auswertung der erfassten morphologischen Parameter aufweist.
5. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine Datenbank mit für Zellen, Zellverbände und/oder Gewebe typischen Referenzparametern vorgesehen ist und dass die Vorrichtung Vergleichsmittel aufweist, mittels derer die erfassten Parameter mit den Referenzparametern verglichen werden.
6. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyseeinheit Mittel aufweist, mittels derer benachbarte Pixel eines erfassten Bildes mit ähnlichem Helligkeitswert zu einem Bildobjekt zusammengefasst werden.
7. Vorrichtung zur Kultivierung von Zellen, Zellverbänden und/oder Gewebe mit einem Inkubator, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung ferner eine Vorrichtung zur objektiven Charakterisierung von Zellen, Zellverbänden und/oder Gewebe gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 aufweist.
8. Vorrichtung zur Kultivierung von Zellen nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung ferner einen Manipulator, einen Transporter zum Transport eines oder mehrerer Zellkulturgefäße zwischen dem Inkubator, Manipulator und der Analyseeinheit sowie eine Steuereinheit zum Betrieb der Vorrichtung aufweist.
9. Vorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Steuereinheit derart ausgeführt ist, dass die Vorrichtung automatisch betrieben wird.

10. Verfahren zur Charakterisierung von Zellen, Zellverbänden und/oder Gewebe, bei dem morphologische Parameter der Zellen, Zellverbände und/oder von Gewebe erfasst werden und die erfassten morphologischen Parameter so dann zum Zwecke der objektiven morphologischen Charakterisierung der Zellen, Zellverbände und/oder des Gewebes ausgewertet werden.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass aus den erfassten Parametern zum Zwecke der Auswertung für die Zellen, die Zellverbände und/oder das Gewebe charakteristische statistische Werte bestimmt werden.
12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die statistischen Werte mit Werten aus einer Referenzdatenbank verglichen werden, die für Zellen, Zellverbände und/oder Gewebe charakteristische Werte enthält.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren weiterhin die Kultivierung von Zellen, Zellverbänden und/oder von Gewebe umfasst.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellkultivierung in Abhängigkeit von den ausgewerteten Parametern vorgenommen wird.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Erfassung und Auswertung der morphologischen Parameter sowie die Kultivierung der Zellen automatisiert erfolgt.

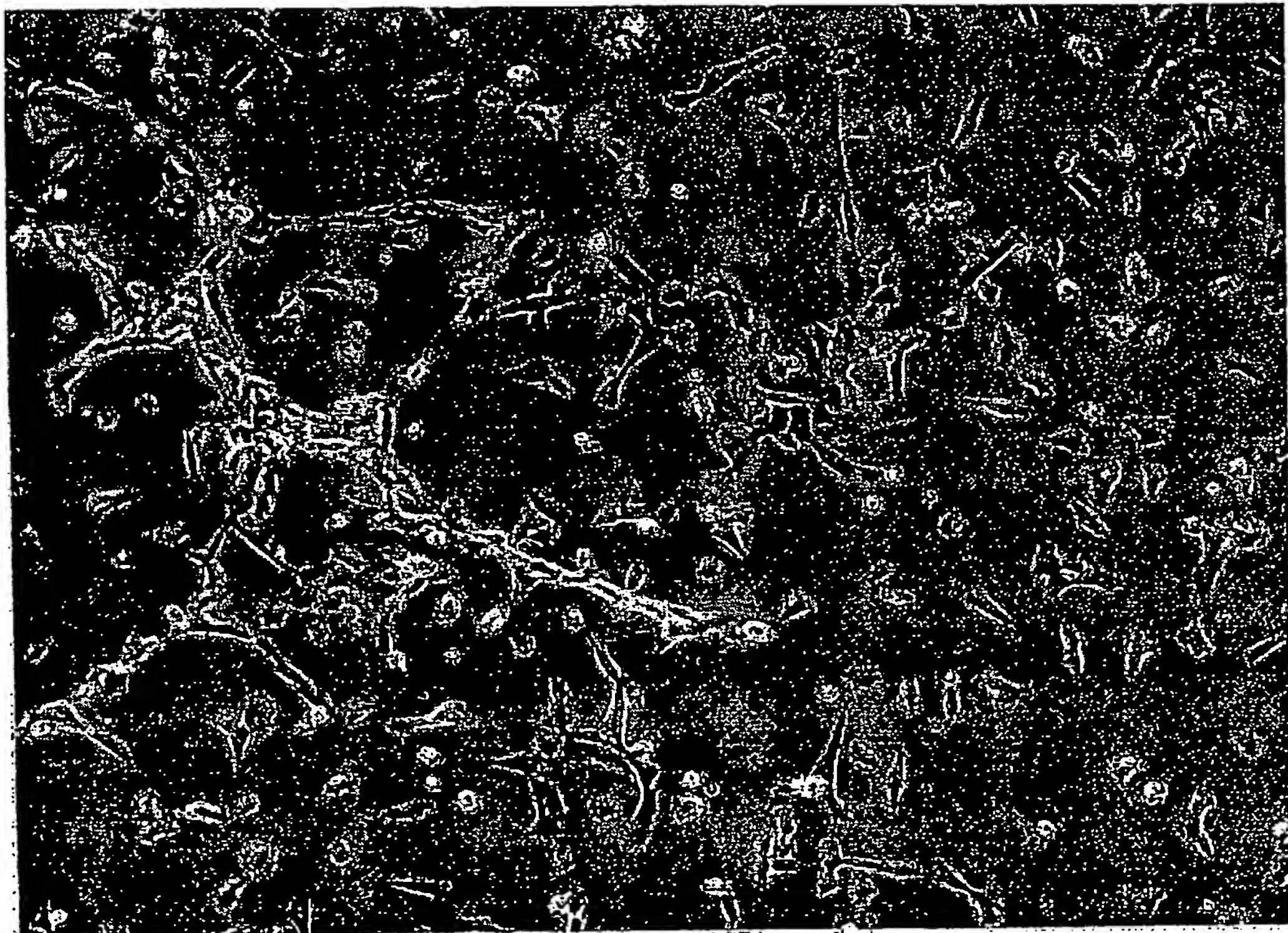


Fig. 1

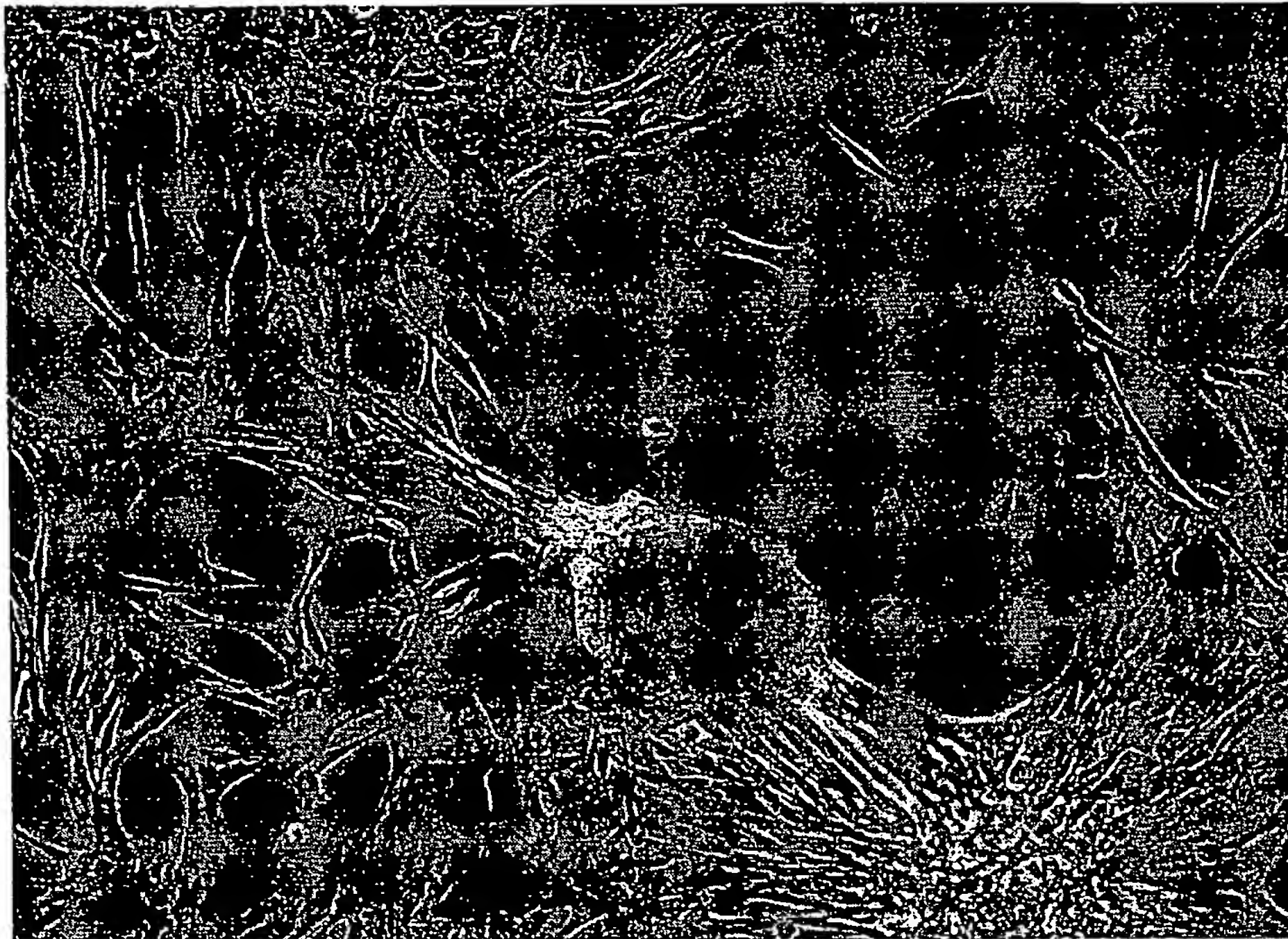


Fig. 2

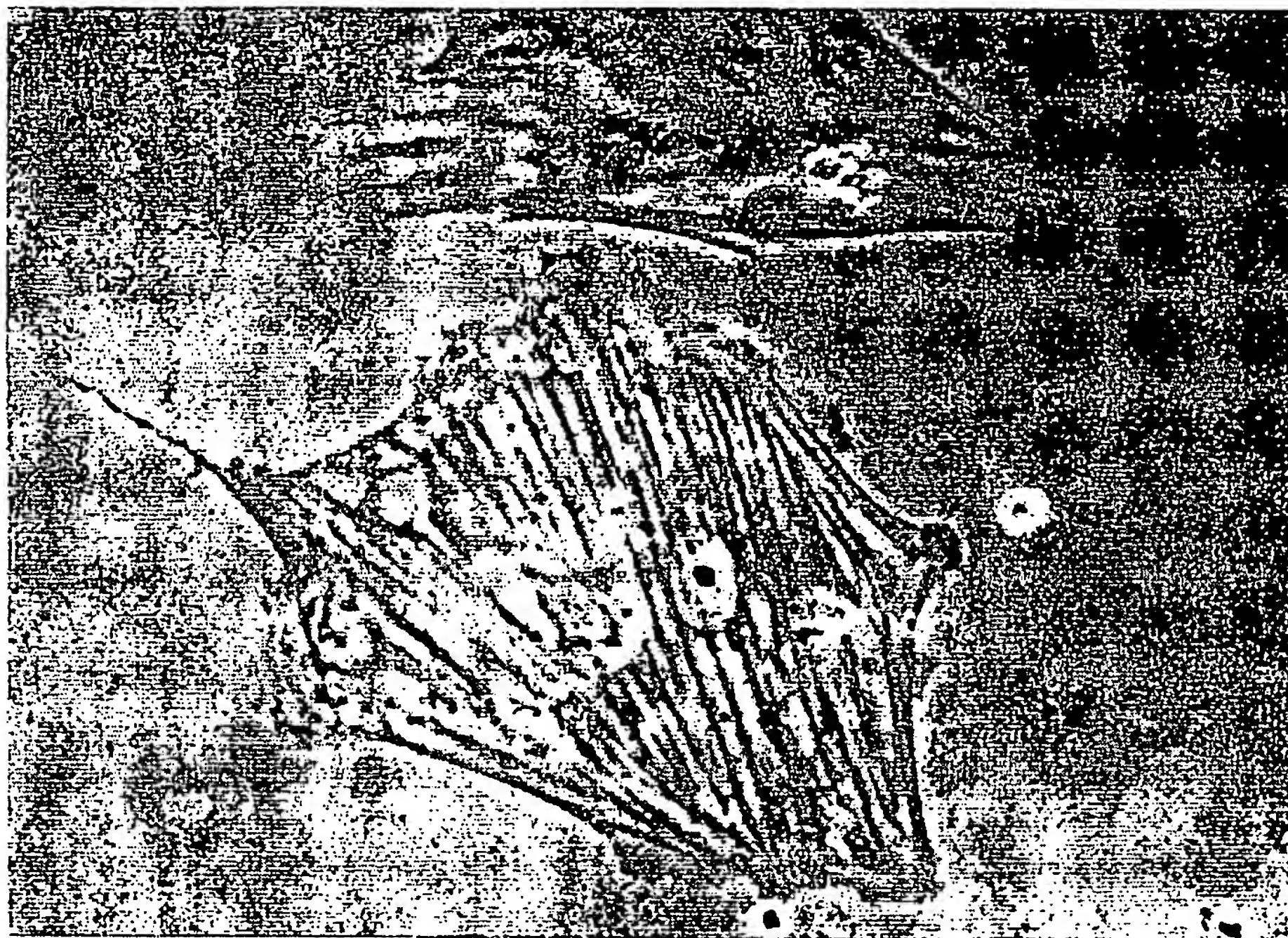


Fig. 3

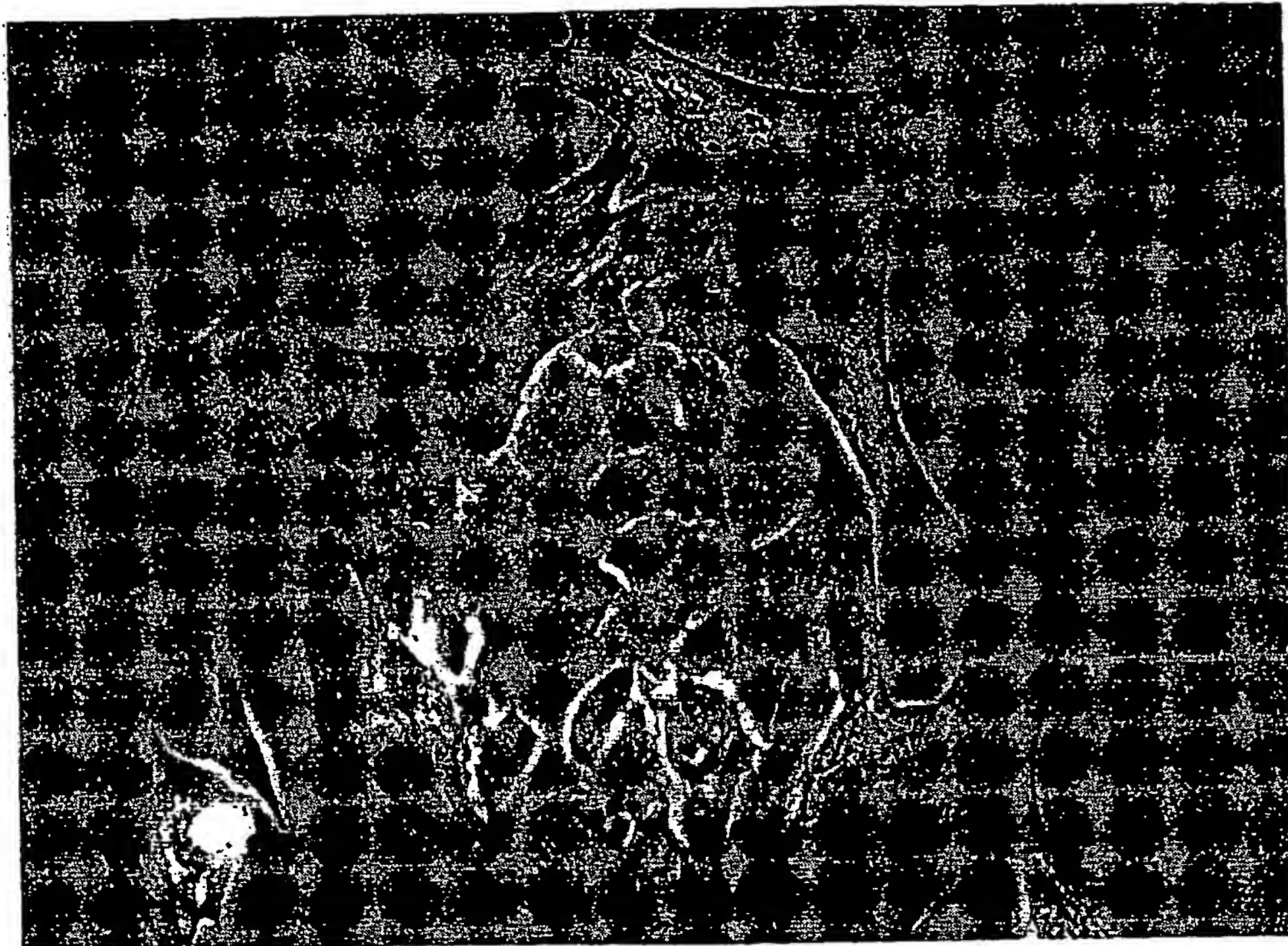


Fig. 4

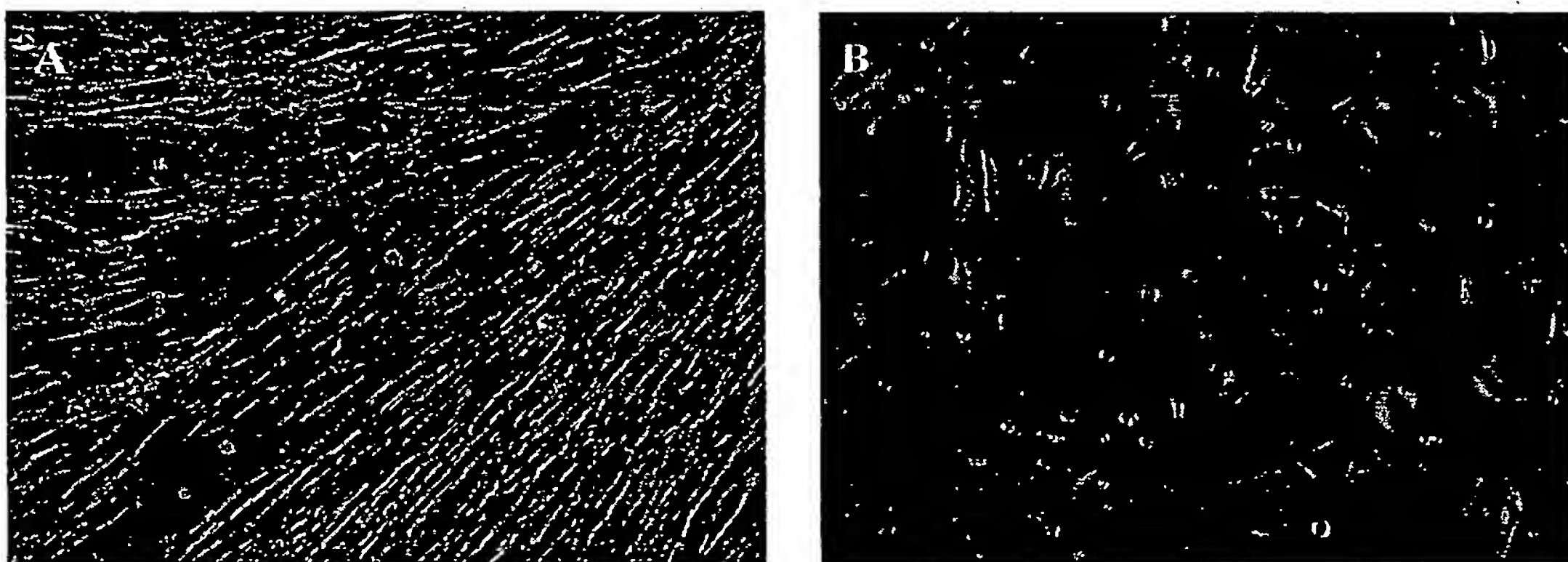


Fig. 5

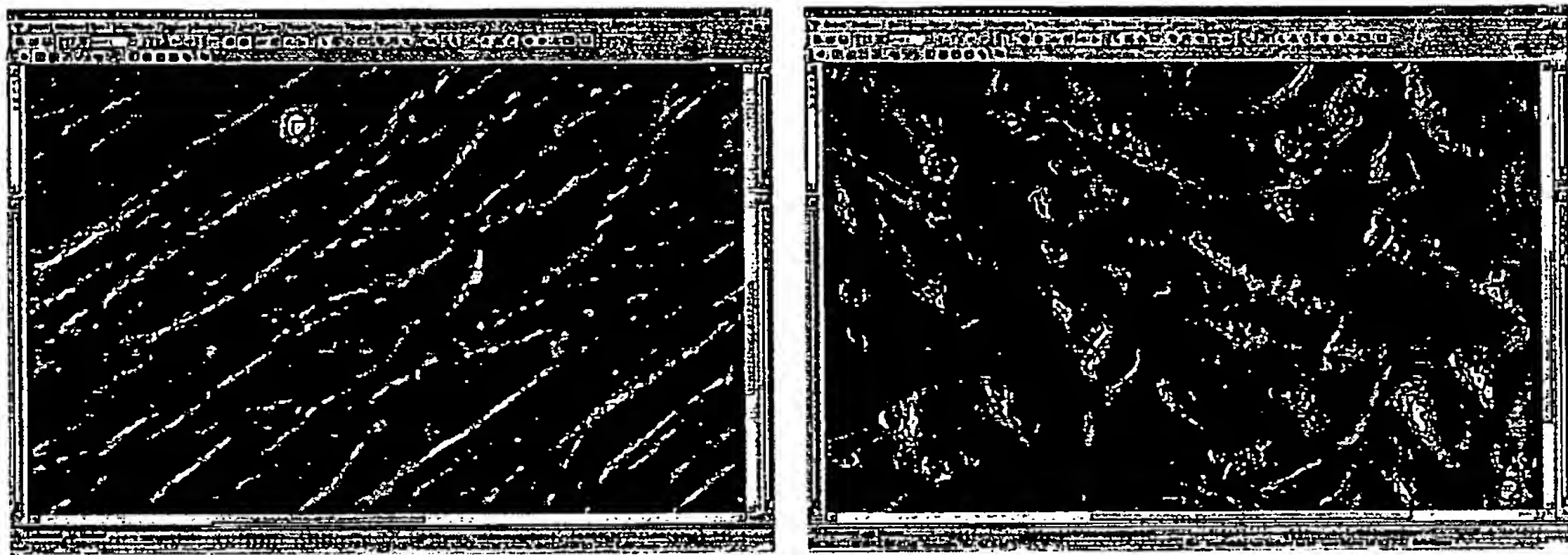


Fig. 6

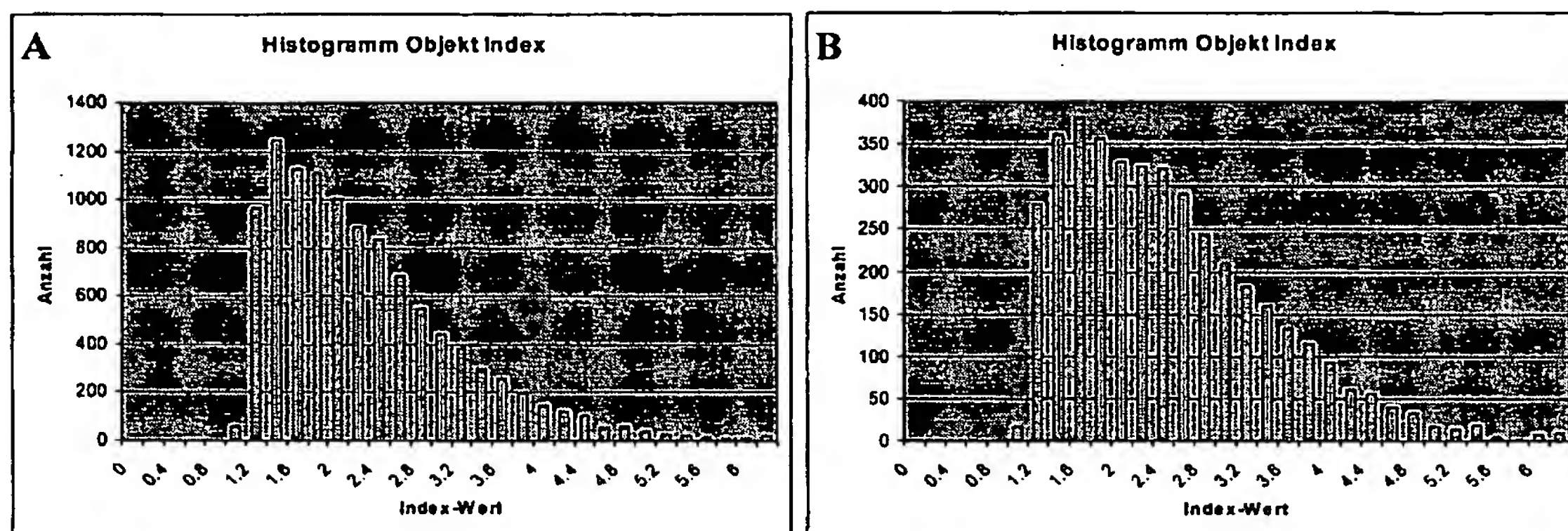


Fig. 7a

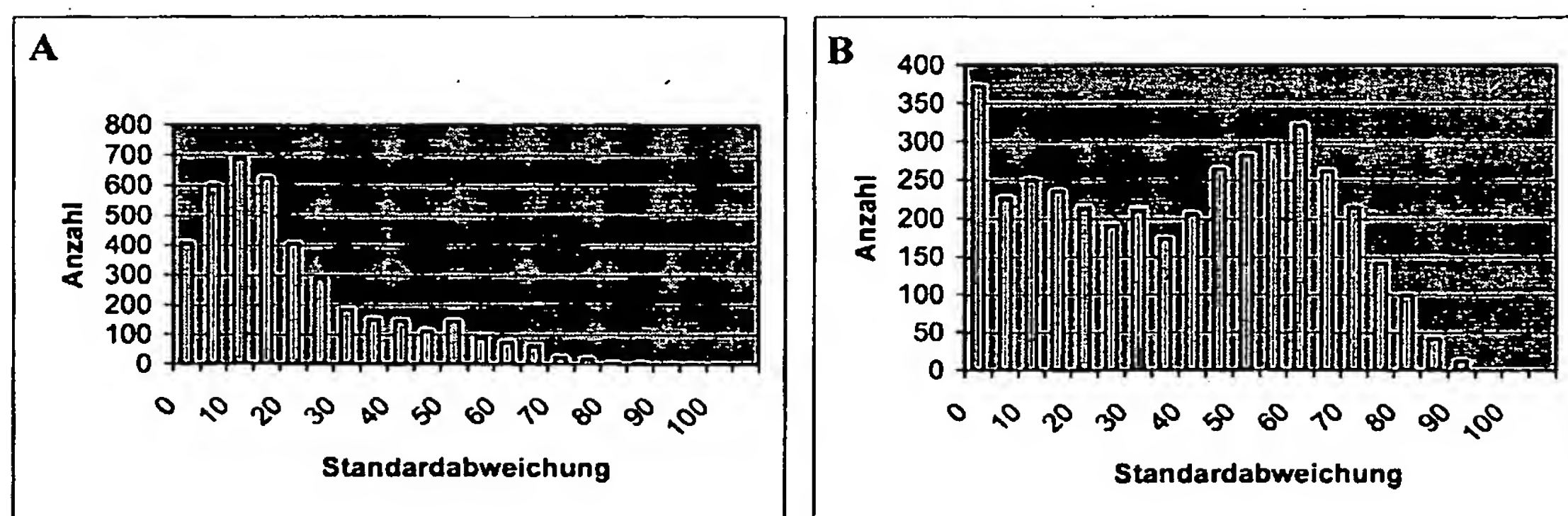


Fig. 7b

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. August 2005 (25.08.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/078066 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12M 1/34

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/001347

(22) Internationales Anmeldedatum:
10. Februar 2005 (10.02.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 006 781.3
11. Februar 2004 (11.02.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
[DE/DE]; Arcisstrasse 21, 80333 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EBLENKAMP,
Markus [DE/DE]; Lisztstrasse 18, 81677 München (DE).
STEINSEIFER, Ulrich [DE/DE]; In der Stockwiese 19,
85410 Haag (DE). WINTERMANTEL, Erich [DE/DE];
Arnoldstrasse 8, 85402 Kranzberg (DE).

(74) Anwalt: HERRMANN, Uwe; Lorenz Seidler Gossel,
Widenmayerstrasse 23, 80538 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 2. März 2006

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR THE CHARACTERIZATION OF CELLS, CLUSTERS, AND/OR TISSUE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR CHARAKTERISIERUNG VON ZELLEN, ZELLVERBÄNDEN
UND/ODER GEWEBE

(57) Abstract: The invention relates to a device for characterizing cells, clusters, and/or tissue, comprising an analytic unit that is
provided with means which are used for detecting morphological parameters of cells, clusters, or tissue. Said analytic unit is also
provided with means that are used for evaluating the detected morphological parameters in order to characterize the cells, clusters, or
tissue in an objective morphological manner. The invention further relates to a method for objectively characterizing cells, clusters,
and/or tissue.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Charakterisierung von Zellen, Zellverbänden und/oder Ge-
webe mit einer Analyseeinheit, die Mittel aufweist, mittels derer morphologische Parameter von Zellen, Zellverbänden oder Gewebe
erfasst werden, und die ferner Mittel aufweist, mittels derer die erfassten morphologischen Parameter zum Zwecke der objektiven
morphologischen Charakterisierung der Zellen, Zellverbände oder des Gewebes ausgewertet werden. Die Erfindung betrifft ferner
ein Verfahren zur objektiven Charakterisierung von Zellen, Zellverbänden und/oder von Gewebe.

WO 2005/078066 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/001347

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12M1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 316 793 A (LEIST, CHRISTIAN; BALZER, ANDREAS) 4 June 2003 (2003-06-04) paragraph '0044! - paragraph '0057!; claims 1,7,9,12	1,10
X	EP 0 468 705 A (HITACHI, LTD) 29 January 1992 (1992-01-29) page 4, line 21 - page 11, line 56	1,10
X	EP 0 340 783 A (HITACHI, LTD) 8 November 1989 (1989-11-08) page 5, line 16 - page 9, line 33	1,7,10
A	US 2001/041347 A1 (SAMMAK PAUL ET AL) 15 November 2001 (2001-11-15) column 3, paragraph 22 - paragraph 35	1,10

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 October 2005

Date of mailing of the international search report

04/11/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Clement, J-P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/001347

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1316793	A	04-06-2003	NONE	
EP 0468705	A	29-01-1992	CA 2047876 A1	26-01-1992
			JP 2510771 B2	26-06-1996
			JP 4084884 A	18-03-1992
			US 5403735 A	04-04-1995
EP 0340783	A	08-11-1989	DE 68909997 D1	25-11-1993
			DE 68909997 T2	19-05-1994
			US 5162204 A	10-11-1992
US 2001041347	A1	15-11-2001	NONE	

INTERNATIONALES RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/001347

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12M1/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Researchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12M

Researchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwandete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 1 316 793 A (LEIST, CHRISTIAN; BALZER, ANDREAS) 4. Juni 2003 (2003-06-04) Absatz '0044! - Absatz '0057!; Ansprüche 1,7,9,12	1,10
X	EP 0 468 705 A (HITACHI, LTD) 29. Januar 1992 (1992-01-29) Seite 4, Zeile 21 - Seite 11, Zeile 56	1,10
X	EP 0 340 783 A (HITACHI, LTD) 8. November 1989 (1989-11-08) Seite 5, Zeile 16 - Seite 9, Zeile 33	1,7,10
A	US 2001/041347 A1 (SAMMAK PAUL ET AL) 15. November 2001 (2001-11-15) Spalte 3, Absatz 22 - Absatz 35	1,10



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. Oktober 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/11/2005

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Clement, J-P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/001347

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 1316793	A	04-06-2003	KEINE		
EP 0468705	A	29-01-1992	CA	2047876 A1	26-01-1992
			JP	2510771 B2	26-06-1996
			JP	4084884 A	18-03-1992
			US	5403735 A	04-04-1995
EP 0340783	A	08-11-1989	DE	68909997 D1	25-11-1993
			DE	68909997 T2	19-05-1994
			US	5162204 A	10-11-1992
US 2001041347	A1	15-11-2001	KEINE		